Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über Unterschiede zwischen frischen und älteren Leichenbluthämolysaten

BERND BARTHEL

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0051

Dissertations- und Fotodruck Franz Frank
8 München 13, Zieblandstr. 39, Tel. 597 397

Aus dem Institut für Gerichtliche und Versicherungsmedizin
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Laves

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über Unterschiede zwischen frischen und älteren Leichenbluthämolysaten

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität
zu München

vorgelegt von

Bernd Barthel

aus

Leipzig

1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München.

Berichterstatter: Prof. Laves

Dekan: Prof. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Februar 1968

INHALTSANGABE

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Eigene Untersuchungen	
	a) Methode	4
	b) Befunde	8
III.	Erörterung der Befunde	16
IV.	Zusammenfassung	17
V.	Literatur	19

EINLEITUNG

Die Dünnschichtchromatographie mit ihren vielen Variationsmöglichkeiten wird immer mehr zur Trennung von Substanzgemischen herangezogen. Nach den grundlegenden Arbeiten von Stahl (1) und anderen, untersuchten viele Autoren auch Organextrakte und Körperflüssigkeiten. Darunter nimmt das Blut einen hervorragenden Platz ein. Eine darin enthaltene Gruppe von Substanzen, die Aminosäuren und niedermolekularen Polypeptide ist auf andere Weise nur mit grossem Aufwand zu trennen.

Teichert, Mutschler und Rochelmeyer (2) beschreiben die Trennung von Gemischen aus reinen Aminosäuren auf Kieselgel- und Celluloseplatten mittels schon aus der Papierchromatographie bekannten Laufmitteln. Sie weisen auf die Schwierigkeiten hin, ganz bestimmte Aminosäuren voneinander zu trennen. Dasselbe machte Wollenweber (3) auf Cellulose mit einer Vielzahl von verschiedenen Laufmitteln. Eine komplizierte Methode geben v. Arx und Neher (4) an, die reine Aminosäuregemische durch 4-dimensionale Trennung wieder in ihre Bestandteile zerlegten. Weitere Arbeiten veröffentlichten Pfeiffer (5), Pataki (6) und Wolfrom (7), die ihre Gemische zum Teil pufferten.

Aminosäuren des Blutes trennten u.a. Dittmann (8), der 15 Substanzen fand, Obienska-Blauth (9), der neben Indolderivaten auch Tryptophan nachwies und Pataki (10, 11), welcher 21 Aminosäuren nachweisen konnte.

Gegenstand dieser Arbeit bildet die Behandlung des Problemes, ob Unterschiede zwischen frischem und faulem Leichenblut mittels der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie nachweisbar sind.

Bevor auf die Untersuchungen selbst eingegangen wird, sei auf Arbeiten hingewiesen, die die Voraussetzung meiner Untersuchungen bilden.

Chemische Unterschiede im vitalen und postmortalen Blut in Bezug auf den Eiweisstoffwechsel sind auf 3 Hauptursachen zurückzuführen:

1. die Agonie
2. die Freisetzung von Enzymen post mortem
3. die Einwirkung von Bakterien

ad 1) Wuhrmann, Maurer, Hebold und Burkhardt fanden im postmortalen Blut einen wesentlich höheren Reststickstoffwert, als bei der letzten klinischen Bestimmung. Als Ursache der agonalen Rest-N-Erhöhung nennen Hebold und Burkhardt: Bakterielle Eiweisspaltung schon zu Lebzeiten (besonders bei eitrigen Prozessen), agonale Anhäufung von Eiweisschlacken bei final nachlassender Nierenfunktion, terminale Phasenverschiebung und Autolyse von Blut und Geweben. (Zitiert nach Laves und Berg (12).

Ferner wird bei der Agonie, besonders bei längerer Agoniedauer, eine erhebliche Menge an Adrenalin dem stoffwechselstimulierenden Hormon, ins Blut abgegeben (12), was zu einer Vermehrung der Eiweissbruchstücke, also auch der Aminosäuren führen dürfte.

ad 2) Neben den extrazellulären Proteasen des Verdauungstraktes gibt es noch intrazelluläre, genannt Kathepsine. Diese Fermente sind in den Lysosomen lokalisiert, intrazellulären Partikeln von Mikrosomen-

bis Mitochondriengrösse, die Granula- oder Bläschengestalt haben. Diese Enzyme liegen hier von ihren Erfolgssubstanzen getrennt und kommen erst zur Wirkung, wenn die Lysosomenmembran zerstört wird und sie in den Plasmaraum der Zellen gelangen. Es ist anzunehmen, dass das erst unter den Bedingungen der Zytolyse geschieht (13). Dieser Vorgang wird als Autolyse bezeichnet.

ad 3) Bakterien können in dem Körper von aussen, vom Magen-Darmtrakt und von eitrigen Prozessen her mit dem Körpersubstanzabbau beginnen (14). Es ist bekannt, dass zahlreiche Bakterien Eiweiss spalten. So kommen auch Hebold und Burkhardt zu dem Schluss, dass der Anstieg des Rest-N des Blutes, zwischen der letzten klinischen Untersuchung und dem Tod zum Teil auf bakterielle Eiweisspaltung zurückgeht. (Zitiert nach L a v e s und B e r g (12).

Die Autolyse ist unmittelbar nach dem Tode der wesentliche Faktor der Änderungen der chemischen Zusammensetzung des Blutes. Nach einer gewissen Zeit tritt sie hinter die Auswirkungen der Fäulnis, das heisst der Bakterieneinwirkung, zurück.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

METHODE

Material:
Es wurde bei gerichtlichen und Verwaltungssektionen Blut aus der Vena Cava entnommen und möglichst bald der Untersuchung zugeführt.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen:
Postmortales Vollblut wird mit der gleichen Menge Aqua bidest. versetzt, um das Hämolysat zu bekommen, bzw. das bei faulem Leichenblut schon vorhandene Hämolysat auf gleiche Konzentrationsverhältnisse zu bringen. 1 ml dieses Hämolysates wird in einem Plastikröhrchen zur Enteiweissung mit 2 ml einer 10%-igen Trichloressigsäurelösung (TCIE-) versetzt und bei 10.000 Umdrehungen pro Minute in einer Zentrifuge (Phywe A.G., Göttingen) abgeschleudert. Man erhält eine wasserklare Lösung.
Ebenso werden zum Vergleich vitale Blutproben behandelt.

Um künstlich gefaultes Blut zu erhalten, werden verschraubbare Plastikbehälter mit frischem Leichenblut gefüllt und mit einer Öse Darminhalt geimpft. Die Plastikbehälter stellt man in einen Wärmeschrank mit einer Temperatur von konstant 37°C. Für Untersuchungen wird jeweils 1/2 ml abpipettiert, mit 1/2 ml Aqua bidest. gemischt, und wie frisches postmortales Hämolysat behandelt. Die TC1E-Extrakte sind in den ersten Tagen farblos, später gelblich. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank nehmen die Extrakte einen rötlichen Farbton an.

Beschichtung der Platten für die Dünnschichtchromatographie:
Benützt wurde die Desaga-Grundausrüstung. Glasplatten mit den Massen 20 x 20, 10 x 20 und 5 x 20 cm werden in einer Schablone mittels eines Streichgerätes mit Kieselgel G nach Stahl beschichtet. Eine gut durchgeschüttelte Mischung aus 25 g Kieselgel G und 50 ml Aqua bidest. genügt, um eine Glasplattenreihe von 110 cm Länge mit einer Schichtdicke von 250 μ zu versehen. Die Platten trocknen über Nacht bei Zimmertemperatur an der Luft und werden dann ohne Wärmeaktivierung (1) verwendet.

Betropfen der Platten:
Nach Bezeichnung der Startlinie und 10cm darüber der zu erreichenden Frontlinie mit jeweils zwei Punkten erfolgt mit einer 10 μl oder 50 μl Mikrospitze (Hamilton, Inc. Whittier, Calif.) das Auftropfen der TC1E-Extrakte an der Startlinie. Folgende Mengen erweisen sich als angebracht:

Bei frischem postmortalen Blut: 8-12 Tropfen zu je 1 μl.
Bei natürlich gefaultem Blut: 3-10 Tropfen zu je 1 μl.
Bei künstlich gefaultem Blut:
anfangs 4 Tropfen zu je 1 μl.
später 2 Tropfen zu je 1 μl.

Diese Mengen werden aufeinandergetropft, wobei nach jedem Tropfen der entstehende Fleck durch einen Föhn getrocknet wird.

Neben den TC1E-Extrakten werden als Vergleichssubstanzen in Trichloressigsäure gelöste Aminosäuresätze der Firma Merck chromatographiert.

Die betropften Platten werden in Glaströge gestellt, deren Deckplatten geschliffen sind. Laufmittel ist ein Gemisch aus 96%-igem Äthyl-

alkohol und Ammoniak (spez. Gewicht: 0,910) im Verhältnis 70:30. Die in die Tröge geschüttete Menge beträgt 50-80 ml. Unterschiede zwischen gesättigten und ungesättigten Kammern ergaben sich bei den vorliegenden Untersuchungen nicht, deshalb wurde auf die Kammersättigung verzichtet.

Andere Laufmittel, wie z.B. n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1) (15) oder Phenol/Wasser (3:1 g/g) (15) ergeben schlechtere Trennergebnisse, hauptsächlich wegen einer ausgedehnten Schwanzbildung der einzelnen Flecken.

Nach Erreichen der eingezeichneten Frontlinie werden die Platten herausgenommen und unter einem Heissluftföhn getrocknet. Anschliessend erfolgt das Besprühen mit stets frischem Ninhydrin-Kupfernitrat-Reagenz Nr. 165 aus (16)

Zusammensetzung:

Lösung I: 0,1 Ninhydrin in 50 ml absol. Äthanol gelöst. Diese Lösung wird mit 10 ml Eisessig und 2 ml Collidin versetzt.

Lösung II: 1 %-ige Kupfernitratlösung in absolutem Äthanol.

Sprühlösung: Vor Gebrauch werden Lösung I und Lösung II im Verhältnis 50 + 3 gemischt.

Zum Schluss werden die besprühten Platten etwa 5 - 10 Minuten im Wärmeschrank bei 110° C belassen. Dabei erfolgt in leichter Abwandlung der Methode nach Brenner und Niederwieser die Bezeichnung der Flecken im Stadium nascendi mit einer Nadel, um bei eventuellem Zusammenfliessen Klarheit über die Zahl der Flecken zu gewinnen.

Nach Abkühlung der Platten kann man zum Zweck der Dokumentation die Flecke mit einer Nadel ganz umranden und die Chromatogramme

xerographieren oder photographieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Xerogramme durch Tuscheumrandung der einzelnen Flecken deutlicher gemacht.

Es zeigte sich, dass zwischen dem Chromatographieren und dem Besprühen einige Tage dazwischenliegen können, ohne dass das Ergebnis beeinträchtigt wird.

Bei schon wieder abgeblassten Chromatogrammen ist ein erneutes Besprühen und Erhitzen nach einigen Tagen noch möglich, um evtl. Notizen zu ergänzen, auch wenn das Bild nun qualitativ schlechter ist.

BEFUNDE

I. Vitale Hämolysate:

Xerogramm A, Blutprobe Nr. 405, gleiche Tropfenzahl wie bei II. Bei vitalen Hämolysaten sind mit den oben angegebenen Auftropfmengen lediglich kaum sichtbare Farbschatten zu erzielen. Nach dem Aufbringen der 2-3-fachen Menge TC1E-Extrakt ergibt sich das gleiche Bild wie bei II, nur ist es verschwommener. Der Grund dafür ist wohl darin zu sehen, dass die Kieselgel G-Schicht für die Tropfen verletzt und durch weitere, nicht angefärbte Substanzen das Bild verfälscht wird. Bessere Ergebnisse erhält man, durch Änderung des Verhältnisses Blut zu Wasser und Trichloressigsäure zugunsten des Blutes, wie A. Winkler (17) in ihrer Arbeit zeigt.

Die Zahl der auftretenden Flecken unterscheidet sich nur insofern von ~~II und~~ III, als der dort direkt über der Auftropfstelle auftretende und nicht einzuordnende Fleck nicht vorhanden ist (Winkler 17).

II. Frische Leichenbluthämolysate:

Xerogramm A, Blutproben Nr. 378, 423, 424.

Es wurden 70 Blutproben untersucht, die aus Leichen genommen wurden, die nicht älter als 2 Tage waren. Es sind 6 Flecken gut erkennbar, die in den Farbtönen zwischen rot und violett liegen, mit Ausnahme des 2. Fleckens von unten, der gelb-orange ist. Bei einer Auftropfmenge, bei der einige Gruppen schon ineinanderlaufen, färbt sich zwischen dem 1. und 2. Fleck von unten eine breite Zone gelb an.

III. Natürlich faule (bis zu 5 Wochen alte) Leichenbluthämolysate:

Xerogramm A, Blutprobe Nr. 465.

Es wurden 30 Blutproben aus Leichen untersucht, die 2 Tage bis 5 Wochen alt waren. Bis etwa 4 Tage nach dem Tod lassen sich bis auf eine wesentliche Intensitätszunahme der einzelnen Flecken keine Unterschiede zu den frischen Hämolysaten feststellen. Dann wird ein Fleck direkt oberhalb der Auftropfstelle erkennbar. In den zur Verfügung stehenden Vergleichssubstanzen zeigte sich kein ähnlicher R_F-Wert, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann, dass es sich nicht um eine der häufigsten Aminosäuren handelt.

Die Zunahme der Intensität aller Flecken ist nach den vorliegenden Ergebnissen bei gleichen Verhältnissen post mortem deutlich vom Alter der Leichen abhängig. Einige wesentliche Ausnahmen sind, soweit der Aufenthalt der Leiche zwischen Tod und Sektion eruiert werden konnte, sehr wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Luft- und Wassertemperaturen bedingt, denen die Leichen bis zur Sektion ausgesetzt waren.

IV. Künstlich gefaulte Hämolysate:
Es wurden 4 Blutproben untersucht, die bis zu 6 Wochen im Wärmeschrank standen. Die Xerogramme B und C zeigen eine dieser Reihen. Die anderen sind ähnlich ausgefallen. Geringe Unterschiede beruhen wohl auf den verschiedenen Bakterienstämmen.

Am 1. Tag steigt bei 2 Flecken die Intensität an und der unterste Fleck taucht auf. Anschliessend werden alle Flecken bis zum 5. Tag schwächer, ausser dem untersten, der stärker hervortritt. Ab dem 5. Tag werden alle Farbflecke stärker und behalten dann bis zum Schluss der Reihe ihre Intensität bei. Es schält sich ein Bild heraus, das zwar stärker gefärbt ist, aber im Prinzip dem des natürlich gealterten Blutes gleicht. Die zum Teil etwas verschieden erscheinenden R_F-Werte erklären sich durch verschiedene Tropfenzahlen.

Mit einiger Wahrscheinlichkeit ist anzunehmen, dass der grösste Teil der Flecken Aminosäuren oder niedermolekulare Polypeptide sind. Dafür sprechen:

1. Mit AS vergleichbare R_F-Werte
2. Gleiche Farbnuancen wie reine Aminosäuren bei Darstellung mit einem relativ spezifischen Anfärbereagenz.

V. Zur Beschreibung der Lage der Flecken wurden reine Aminosäuren mitchromatographiert, die durch starke Anfärbung wieder lokalisiert werden konnten. Siehe Xerogramme D und E.

Unterster = 1. Fleck: Kein ähnlicher R_F-Wert aufzufinden.
2. Fleck: R_F-Wert ähnlich wie bei Lysin (LYS)
3. Fleck: " " " " " Glutaminsäure (GLU)
4. Fleck: " " " " " Serin (SE) und Glycin (GLY)
5. Fleck: " " " " " Threonin (THRE)
6. und 7. Fleck: " " " " " Leucin (LEU), Methionin (MET) und Valin (VAL) und Thyrosin (TYR)

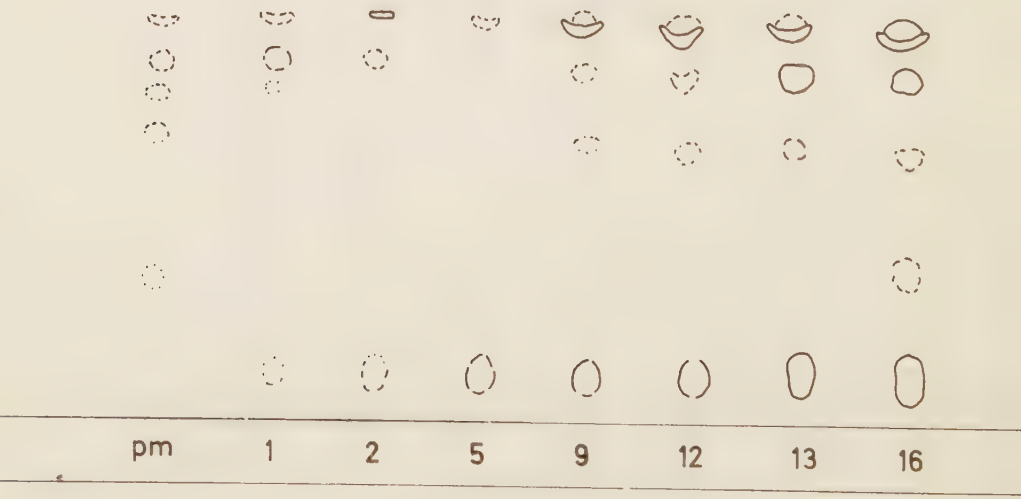
Tryptophan (TRYPT) (bräunlich) lässt sich wegen der Farbe, Histidin (HIST), Prolin (PRO) (gelb), Arginin (ARG) und Asparaginsäure (ASP) (blau) lassen sich wegen ihrer nicht vorkommenden R_F-Werte nicht zuordnen.

Dabei ist sehr wahrscheinlich, dass diese Substanzen zwar vorhanden (Pataki) sind, aber dass die vorliegende Methode für die geringen Mengen zu grob ist.

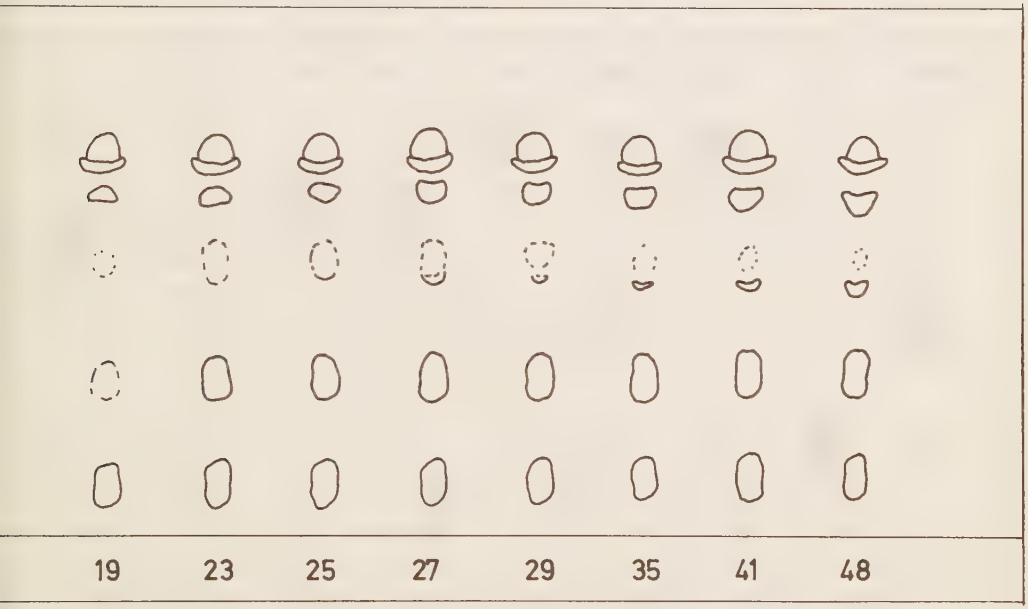
XEROGRAMM A

405	423	424	465	378	378 1 tag	378 16 tage

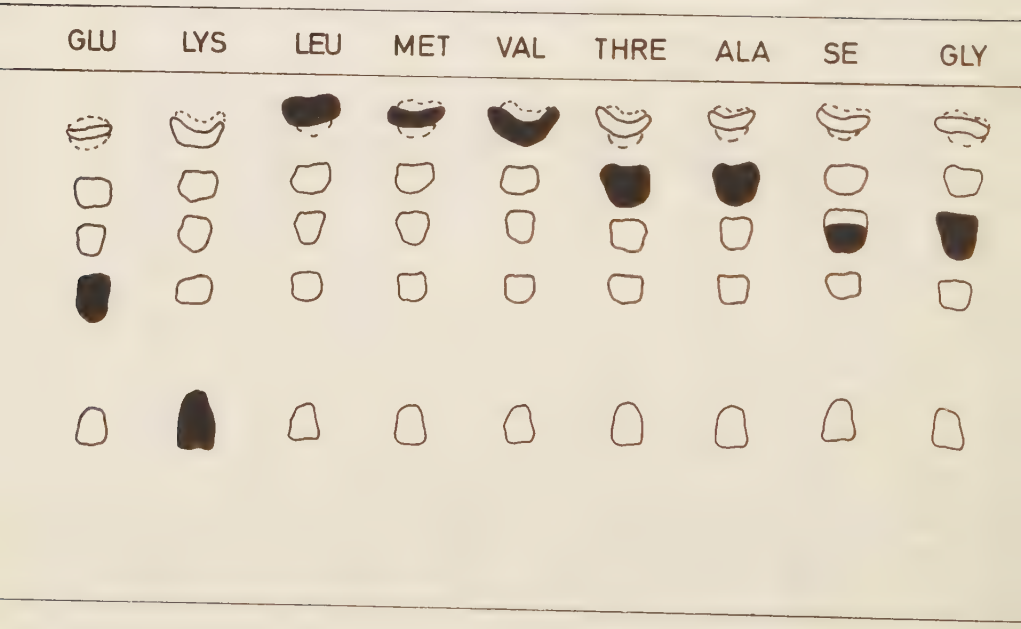
XEROGRAMM B



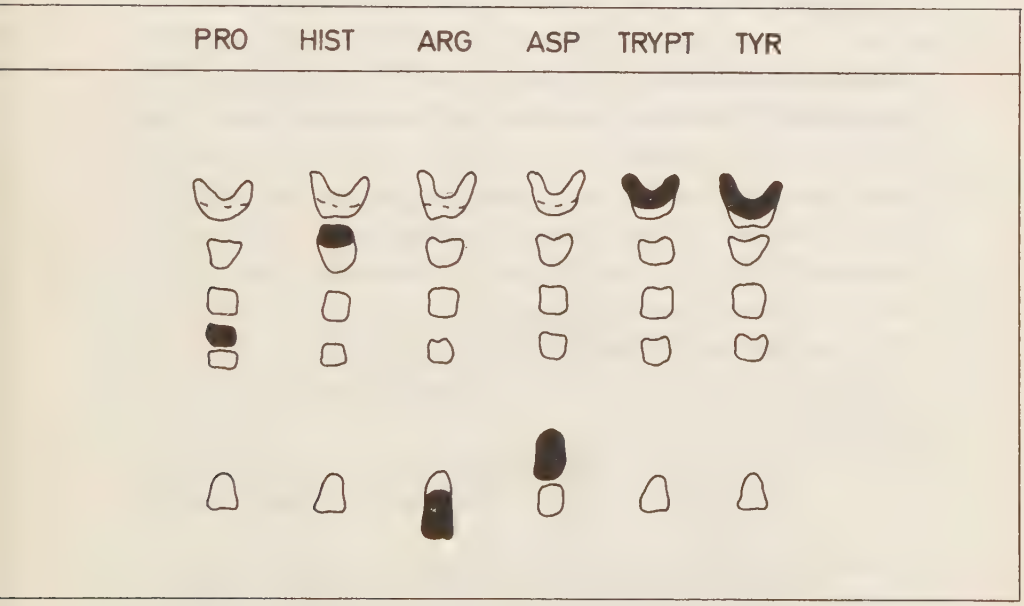
XEROGRAMM C



XEROGRAMM D



XEROGRAMM E



ERÖRTERUNG DER BEFUNDE

Bereits in der Agonie wird Eiweiss teils fermentativ, teils bakteriell angegriffen. Nach dem Tode tritt schon bald eine teilweise Auflösung des Eiweisses und anderer Stoffe durch die in den Organen selbst enthaltenen Fermente ein. Je nach den äusseren Umständen tritt dieser als Autolyse bezeichnete Vorgang bald früher, bald später ein. Durch die Mitwirkung von Bakterien, die aus dem Körper selbst oder aus der Umgebung stammen, geht dieser Vorgang in Fäulnis über.

Aus diesen Gründen ist das vermehrte Auftreten von Aminosäuren im Leichenblut im Gegensatz zu vitalem Blut ebenso verständlich (17), wie die beobachtete Vermehrung mit dem Alter der Leichen. Auf Grund einer eindimensionalen Dünnschichtchromatographie des Blutes ist, wenn überhaupt, nur mit grossen Einschränkungen, bei Beachtung der äusseren Umstände und bei Vergleich mit Blutproben bekannten Alters, eine ungefähre Altersangabe einer Leiche möglich. Beide Angaben gelten, dem Material der Untersuchungen entsprechend, nur für etwa 1 bis 1 1/2 Monate post mortem. Die Aussage kann nur soweit gehen, dass man sagt:

1. Die Autolyse und die Fäulnis sind weiter fortgeschritten als im Vergleichsblut, wobei aber der Faktor Agonie ausser Acht gelassen ist.
2. Bei gleichen Voraussetzungen: Das unbekannte Blut ist einige Tage älter oder frischer als das Vergleichsblut, ohne eine wirkliche Zeitangabe machen zu können.

Die Methode ist im Vergleich zu anderen Verfahren zur Altersbestimmung von Leichen also nicht geeignet.

Eine durch Autolyse und Fäulnis bedingte Änderung der Aminosäurenzusammensetzung nachzuweisen, ist mit den beschriebenen Methoden nicht möglich.

Das Auftreten neuer Flecken mit ähnlichen R_F-Werten wie Aminosäuren ist nicht nachweisbar. Dabei ist aber zu beachten, dass manche Aminosäuren den gleichen R_F-Wert haben und dass ihre Mengen vielleicht zu gering sind, um quantitativ mit Hilfe des von mir verwendeten Verfahrens exakt nachgewiesen zu werden.

Interessant ist das Auftreten eines nicht einzuordnenden Fleckens, der mit der Dauer der postmortalen Vorgänge in der Leiche an Intensität zunimmt, und dessen R_F-Wert gegen das Vorliegen einer Aminosäure spricht.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine literarische Einführung soll auf die Aktualität der Blutuntersuchung auf Aminosäuren hinweisen. Es wurde auf Arbeiten hingewiesen, die die Grundlagen der vorliegenden Untersuchungen bilden.

Es wurde mit Trichloressigsäure enteiweisste Hämolysate frischer und bis zu 5 Wochen alter Leichen auf Kieselgel G dünnschichtchromatographiert und mit einem Reagenz zur Anfärbung von Aminosäuren und niedermolekularen Polypeptiden besprüht. Durch Impfung mit Darminhalt künstlich gealterte Leichenbluthämolysate wurden in gleicher Weise untersucht. Wesentliche Unterschiede in Form, Zahl und Far-

be der Flecken mit vergleichbaren Aminosäure-R_F-Werten konnten nicht gefunden werden; hingegen eine deutlich stärker werdende Färbung der vorhandenen Flecken, abhängig vom Alter der Leichen bzw. von der Dauer des Faulens, der Autolyse und der Agonie. Von denselben Faktoren abhängig ist ein Fleck direkt oberhalb der Auftropfstelle, dessen R_F-Wert gegen eine Aminosäure spricht.

Chemisch-analytische Versuche zur Identifizierung der Flecken wurden nicht gemacht. Dagegen erfolgten zur Beschreibung der Lage der Flekken Parallelversuche mit reinen Aminosäuren.

Zum Schluss wurde Stellung genommen, ob die Methode zur forensisch-medizinisch wichtigen Altersbestimmung von Leichen geeignet ist.

LITERATURVERZEICHNIS

1. E. Stahl: Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag 1962
2. K. Teichert, E. Mutschler und H. Rochelmeyer: Deutsche Apothekerzeitung 100 (1960) S. 283
3. P. Wollenweber: J. Chromatog. 9 (1962) S. 369
4. E.v. Arx u. R. Neher: J. Chromatog. 12 (1963) S. 329
5. J.J. Pfeiffer: Mikrochim. Acta (1962) S. 529
6. G. Pataki: J. Chromatog. 16 (1964) S. 541
7. M.L.Wolfrom, D.L. Patin u. R.M. de Lederkremer: Chem. and Ind. (1964) S. 1065
   J. Chromatog. 17 (1965) S. 488
8. J. Dittmann: Z. klin. Chem. 1 (1963) S. 190
9. J. Obienska-Blauth, H. Kraczkowski, H. Brzusziewicz, Z. Zagorski: J.Chromatog. 17 (1965) S. 288
10. G. Pataki: Z. klin.Chem. 2 (1964) S. 129
11. G. Pataki u. M.Keller: Z.klin. Chem. 1 (1963) S. 157
12. Laves / Berg: Agonie; Schmidt-Römhild Lübeck 1965
13. Carlson: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
14. Hamperl: Lehrbuch der pathologischen Anatomie
15. M. Brenner, G. Pataki und A.Niederwieser: International Symposium on Thin Layer Chromatography, Rom 1963
16. E. Merck A.G., Darmstadt: Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie
17. A. Winkler: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über Unterschiede zwischen vitalen Blutproben und frischen Leichenblutproben. Dissertation.

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Professor Laves für die Überlassung des Themas, für die Einrichtung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut und für seine freundlich gewährte Hilfe.

Herrn Ing. Corell möchte ich für die Einführung in die Technik der Methode danken.

LEBENSLAUF

Als Sohn des Gynäkologen Dr. med. Rudolf Barthel und seiner Ehefrau Eva, geb. Zehetmayr, wurde ich am 20. 5. 1942 in Leipzig geboren.
Von 1946 bis 1948 wohnte ich mit meiner Familie in Garmisch und besuchte nach dem Umzug nach Hohenschäftlarn/Isartal dort die Volksschule von 1948 - 1952.

Im September 1952 trat ich in das Realgymnasium in Icking/Isartal ein, das ich im Juli 1961 mit der Reifeprüfung abschloss.

Im Wintersemester 1961/62 begann ich das Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität München. Hier bestand ich im April 1964 die ärztliche Vorprüfung und im Dezember die ärztliche Prüfung.